

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Helena Kočová**

Androgeneze

Androgenesis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha, 2018

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za odborné konzultace a připomínky k průběhu tvorby bakalářské práce. Zároveň děkuji všem těm, kteří věřili, že práci zvládnou dokončit v termínu.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.8.2018

.....  
Helena Kočová

## **Abstrakt (česky)**

Androgeneze v rostlinné říši je zajímavý jev, kdy je nový jedinec regenerován ze samčího gametofytu. Mající gametofytický, tedy haploidní počet chromozomů, tyto rostliny mají potenciální využití jak ve výzkumu, tak i pro tvorbu nových genotypů. Zdvojením genetické informace se totiž získají kompletně homozygotní rostliny, které mohou být použité ke šlechtění. Mikrospory zároveň představují unikátní systém pro studium totipotence, buněčné proliferace, diferenciace i embryogeneze. Nicméně u mnohých významných plodin a zároveň i u některých modelových rostlin nebyla technologie androgeneze dosud efektivně zvládnutá.

Cílem této bakalářské práce je shrnout známé vědomosti o androgenzi, od historického kontextu až po nejnovější poznatky, včetně metod tvorby, průběhu vzniku, komplikací a nakonec též možného využití získaných dihaploidních rostlin.

**Klíčová slova:** androgeneze, samčí gametofyt, mikrosporová embryogeneze, pyl, totipotence, buněčná diferenciace, stres, haploid

## **Abstract (anglicky)**

Androgenesis in the plant kingdom is an interesting phenomenon, in which a new individual is regenerated from male gametophyte. Having gametophytic, i.e. haploid number of chromosomes, these plants are potentially useful in research as well as for the generation of new genotypes. Duplication of their genetic information then results in fully homozygous plants, that can be used for breeding. At the same time, microspores represent a unique system for studying totipotency, cell proliferation, differentiation and embryogenesis. However, in many important crops as well as in some model species, such technology has not yet been efficiently managed.

The aim of this thesis is to summarize the knowledge about androgenesis, from the historical context to the latest discoveries, including methods, development, complications and at the end also the possible use of obtained doubled haploid plants.

**Keywords:** androgenesis, male gametophyte, microspore embryogenesis, pollen, totipotency, cell differentiation, stress, organogenesis, haploid



## Seznam zkratek

2,4-D - Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová – syntetický auxin

AP2 – APETALA2

ABA – kyselina abscisová

ABI3 – abscisic acid insensitive 3

AFL – ABI3 + FUS3 + LEC2

BBM – BABYBOOM

CALTECH – Kalifornský technologický institut

CDH3 – helikáza s chromodoménou, z angl. „chromodomain helicase DNA binding protein 3“

DH – dihaploidní (rostlina), dvojitý haploid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ERF – ETHYLENE RESPONSE FACTOR

F1 – první hybridní generace při křížení

FUS3 – FUSCA3

HAP3 – Hook-Associated Protein 3

HSP – proteiny tepelného šoku, z angl. „heat-shock proteins“

LEC, LEC1, LEC2 – LEAFY COTYLEDON (1, 2)

MS médium – médium pro tkáňové kultury sestavené Toshio Murashigem a Folke Skoogem

PCIB – kyselina p-chlorofenoxyisobutyrová – antiauxin

QTL – z anglického „quantitative-trait locus“, lokusy kvantitativních znaků

# Obsah

Abstrakt (česky).....	
Abstract (anglicky).....	
Seznam zkratek.....	
<b>1. Úvod - co je to androgeneze.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Historie.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Metody.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Postup.....</b>	<b>5</b>
3.1.1 Prašníková kultura.....	6
3.1.2 Kultura izolovaných mikrospor.....	7
3.1.3 Nepřímá androgeneze.....	7
<b>3.2 Faktory ovlivňující pylovou embryogenezi.....</b>	<b>8</b>
3.2.1 Složení médií.....	8
3.2.2 Genotyp.....	10
3.2.3 Vývojové stádium pylu.....	11
3.2.4 Ošetření před kultivací.....	12
3.2.5 Kultivační podmínky.....	13
3.2.6 Fyziologický stav mateřské rostliny.....	13
<b>3.3 Tvorba dihaploidních rostlin.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Průběh vývoje pylových embryí.....</b>	<b>15</b>
4.1 Morfologické znaky a polarita embryogenních pylových zrn.....	15
4.2 Původ pylových embryí.....	16
4.3 Genetická regulace.....	17
4.3.1 Časná fáze indukce embryogeneze.....	17
4.3.2 Regulátory genové exprese.....	18
<b>5. Problémy s androgenezí.....</b>	<b>20</b>
5.1 Albinismus.....	21
<b>6. Význam a využití.....</b>	<b>22</b>
6.2 Studium.....	24
<b>7. Závěr.....</b>	<b>25</b>
<b>8. Seznam použité literatury.....</b>	<b>26</b>

## 1. Úvod - co je to androgeneze

Androgeneze je zvláštní způsob reprodukce, kdy se na vzniku další generace podílí pouze genetická informace samčí pohlavní buňky (spermie u živočichů, spermatické buňky semenných u rostlin). U přirozeně se vyskytující androgeneze mají buňky buď schopnost eliminovat mateřský genom (Rieger et al. 1968), nebo se v samičí gametě genom zřejmě vůbec nemusí nacházet (Pichot et al. 2008). V obou případech je poté třeba, aby nově vzniklý jedinec byl buď životaschopný jako haploid, nebo aby byl schopen záhy duplikovat svůj genom do diploidního stavu. Některé druhy tento problém vyřešily také produkcí neredukovaných pohlavních buněk.

V rostlinném světě se androgeneze přirozeně vyskytuje u cypřiše tassilského (*Cupressus dupreziana*). U tohoto stromu je to jediný popsáný způsob reprodukce. Jeho pyl je diploidní (Pichot and El Maataoui, 2000) a představuje tak jediný zdroj genetické informace pro další generaci, embryo je tedy klonem otcovské rostliny. Samičí zárodečný vak (zřejmě) neobsahuje žádný genom a slouží jen jako prostředí pro vývoj cizího embrya. Rostlinám se tedy do samičí tkáně nevyplatí příliš investovat a produkují jen menší množství životaschopných semen.

Když se pyl cypřiše tassilského (*Cupressus dupreziana*) dostane do blízkosti vajíčka příbuzného cypřiše stálezeleného (*Cupressus sempervirens*), který se rozmnožuje pohlavně (má redukované gamety), vzniklé embryo je diploidní a identické s otcovskou rostlinou cypřiše tassilského (Pichot et al., 2001), rostlina má tedy zřejmě schopnost eliminovat mateřský genom. Když je naopak vajíčko cypřiše tassilského opyleno pylem cypřiše stálezeleného, vznikají haploidní, případně diploidní rostliny cypřiše stálezeleného (Pichot et al., 2008). Následná analýza diploidních rostlin cypřiše stálezeleného prokázala, že kromě třech případů byly všechny homozygotní (Nava et al., 2010). Vznikly tedy buď fúzí dvou gamet stejného gametofytu nebo duplikací genomu v časně fázi embryogeneze. Na vzniku oněch třech diploidů se pak zřejmě podílely dvě gamety ze dvou různých gametofytů.

Opakem androgeneze je gynogeneze, kdy se na vzniku další generace podílí pouze genetická informace mateřského organismu. Podle některých dělení se termíny androgeneze a gynogeneze používají pouze pokud se na vzniku nového jedince podílí redukovaná gameta, v případě neredukované gamety nebo jiné buňky se jedná o paternální či maternální apomixii. Za paternální apomixii se pak považuje výše popsáný případ cypřiše tassilského, zatímco mezi častější maternální apomixie patří aposporie nebo diplosporie běžně se vyskytující u množství rostlinných druhů. Při diplosporii vzniká zárodečný vak z neredukované mateřské buňky megasporu, zatímco u aposporie se na jeho vzniku podílí jiná buňka nucellu. Další vývoj embrya

a semene poté pokračuje bez oplození. Někdy dochází i k tzv. adventivní polyembryonii, kdy například vedle zygotického embrya dochází k tvorbě embryí i z buněk sousedících se zárodečným vakem a v budoucím semeni jich tak může být několik (více viz Koltunow, 1993).

Androgeneze a gynogeneze se také dají souhrnně považovat za haploidní techniky, tedy techniky umožňující tvorbu rostlin s gametickým počtem chromozomů. Případný polyploidní původ mateřských rostlin se v terminologii často zanedbává. Rostliny získané gametofytickou embryogenezí mající gametický počet chromozomů se často označují jako haploidní, nezávisle na tom, zda byla mateřská rostlina tetraploid, jako tomu je například u tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) nebo hexaploid jako pšenice seté (*Triticum aestivum*).

Přirození či spontánní haploidi se s nízkou frekvencí vyskytují u řady rostlinných druhů, ať už je jejich genom paternálního nebo maternálního původu. Nicméně existují metody, jak je lze experimentálně indukovat. Jedny z prvních metod, též nazývaných klasické, zahrnovaly všemožné zásahy do průběhu opylení a vzniku diploidní zygoty, včetně použití mezidruhových kříženců nebo velmi vzdálených linií téhož druhu, kdy je jeden rodičovský genom (častěji otcovský) v zygotě eliminován (Kimber and Riley, 1963). U kukuřice seté (*Zea mays*) například vznikly protokoly zahrnující indukci vzniku haploidních rostlin pomocí těchto klasických metod (např. použití radioaktivně ozářeného pylu), včetně účinné identifikace vzniklých haploidů, diploidizace a případného další využití (Chase, 1969). Někdy vznikly haploidní rostliny i pomocí metod navržených spíše pro tvorbu polyploidních rostlin či indukci pomocí různých fyzikálních nebo chemických faktorů (více viz. Kimber and Riley, 1963).

Kromě přirozeně se vyskytujících haploidních technik a výše zmíněných metod existují také metody využívající *in vitro* technik a explantátových kultur. Oproti klasickým metodám, kdy byla většina haploidních rostlin maternálního původu, zde převládá používání androgeneze nad gynogenezí. Nejspíše proto, že separace a kultivace mikrospor či jejich derivátů bývá prakticky výrazně jednodušší než u samičího gametofytu a zároveň bývá pylových zrn mnohem více. Nicméně existují i případy, kdy je regenerace haploidní rostliny možná pouze gynogenezí, například u cibule kuchyňské (*Allium cepa*, Alan et al., 2004).

S rozvojem technik *in vitro* získává nejvíce na významu pro případné praktické využití právě tato umělá androgeneze. Ostatní techniky k produkci haploidních rostlin bývají často prakticky využitelné jen u omezeného počtu druhů, a proto bude tato práce převážně zaměřena, s přihlédnutím k souvislostem s ostatními metodami, právě na tento typ androgeneze.

## 2. Historie

Historie umělé androgeneze úzce souvisí i s historií *in vitro* kultur. Teorie o možnostech regenerace celých rostlin z jediné buňky byla formulována již počátkem 20. století (Haberlandt, 1902). Trvalo však nějakou dobu, než byly publikovány první výsledky, neboť bylo nutné sestavit vhodná kultivační média, použít patřičné sterilizační metody a nakonec také nalézt a vybrat vhodný rostlinný materiál.

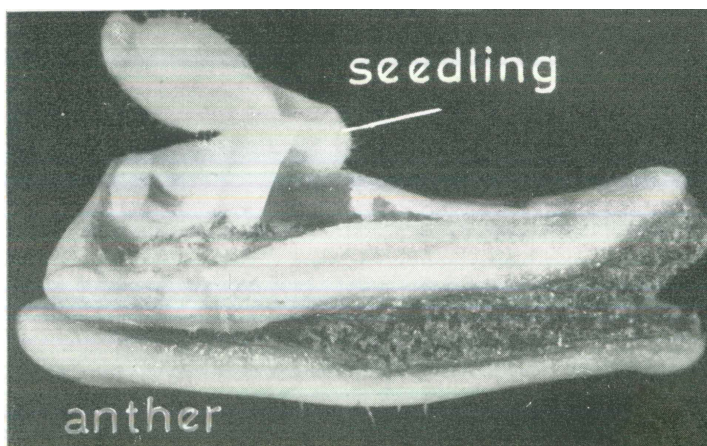
Spontánně haploidní rostliny byly pozorovány již ve dvacátých letech 20. století. První potvrzenou haploidní rostlinou byl durman obecný (*Datura stramonium*, Blakeslee et al., 1922), nicméně brzy jej následovaly další (shrnuť například v review Kimber and Riley, 1963). Předpokládá se, že většina z nich vznikla ze samičího gametofytu, ale bylo potvrzeno i několik androgenních jedinců, například u tabáku byl po zkřížení *Nicotiana digluta* x *Nicotiana tabacum* získán jeden haploidní jedinec tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*, Clausen and Lammerts, 1929). Význam těchto haploidů však nebyl příliš velký. Jejich vznik totiž byl prakticky náhodný a šance je získat byla velmi malá.

V té době byla kultivace pylových zrn něco nepředstavitelného, tudíž se kultivovala spíše vajíčka, respektive celé semeníky. Kultivovala se například vajíčka odstraněná z mateřské rostliny po opylení a sledoval se vývoj plodu v podmínkách *in vitro* (Nitsch, 1951). Později se experimentovalo i s intraovariálním opylením například u máku vlnitého (*Papaver rhoeas*), kdy se semeník ve správnou dobu naplnil suspenzí pylových zrn a následně se sledoval jeho vývoj (Kanta, 1960). Získaná semena byla plně životaschopná. O dva roky později byl experiment úspěšně zopakován včetně kultivace semeníku v podmínkách *in vitro* (Kanta et al., 1962).

Předpokládá se, že první, kdo zkusil kultivovat pylová zrna, byl zřejmě C.D. LaRue. Jeho cílem bylo získat z pylu tkáňovou kulturu. S krytosemenými rostlinami se mu příliš nedařilo, ale nakonec byl úspěšný s pylem tisu (*Taxus*, pravděpodobně *T. brevifolia*). Své výsledky však nedokázal publikovat během svého života a po jeho smrti je za něj zveřejnil jeho žák (Tulecke, 1959). Sám provedl i vlastní experimenty například s pylem jinanu dvojlaločného (*Ginkgo biloba*, Tulecke, 1953 a další).

Prvními, kdo získali embrya z pylových zrn, byli indiští vědci Sipra Guha a Satish Chandra Maheshwari (Guha and Maheshwari, 1964). Jejich objev byl v podstatě náhodný. Satish Maheshwari strávil předtím nějakou dobu v laboratoři Jamese Bonnera v Kalifornském technologickém institutu (CALTECH) ve Spojených státech (poznámka v (Seguí-Simarro, 2016)). Poté se vrátil do Indie do laboratoře botaniky v Novém Dillí, kterou v tu dobu vedl jeho otec Panchan Maheshwari. Laboratoř byla tehdy vybavena prakticky jen potřebami pro tkáňové

kultury a mikroskopii. Napadlo jej tedy kultivovat mladé prašníky a pomocí působení hormonů či jiného ošetření se pokusit změnit průběh meiózy v mitózu nebo obráceně. V té době se k němu připojila Sipra Guha. K experimentu použili prašníky durmanu (*Datura innoxia*), protože v oné době zrovna kvetl ve skleníku tamní botanické zahrady a jeho prašníky jsou velké.



Obrázek 1: Semenáček vyrůstající z prašníku.  
Upraveno podle Guha and Maheshwari, 1967.

Z kultivovaných prašníků ale nečekaně vyrostla embrya, která kromě variabilního počtu děloh vypadala jako běžná zygotická embrya, a vyvinula se v semenáčky. Autoři dva roky později potvrdili, že embrya opravdu pocházejí z pylových zrn a že jsou haploidní (Guha and Maheshwari, 1966).

Popsaný objev odstartoval sérii dalšího výzkumu. Zanedlouho byla embrya odvozená z pylu potvrzena u dalších rostlinných druhů. U tabáku byla embrya zřejmě nezávisle získána ve francouzské laboratoři vedené Jean Paul Nitschem (Bourgin and Nitsch, 1967) a v japonské laboratoři (Nakata and Tanaka, 1968). V jiné japonské laboratoři získali nepřímou androgenezi haploidní rýži setou (*Oryza sativa*, Niizeki and Oono, 1968). Obdobný experiment se podařil i s brukví zelnou (*Brassica oleracea*, Kameya and Hinata, 1970).

Výzkumu francouzské laboratoře byla věnována pozornost až o několik let později od vydání první publikace týkající se haploidních embryí, kdy autoři opublikovali několik článků ve významějších časopisech v anglickém jazyce (Nitsch, 1969; Nitsch and Nitsch, 1969). Na tyto články se pak často odkazuje v souvislosti se složením kultivačního média (tzv. Nitsch medium), ač obdobné médium je popsáno i v předchozích člancích dané laboratoře (Nitsch et al., 1968). Toto médium je v různých úpravách často používáno pro kultivaci prašníků.

V sedmdesátých letech se postupně hromadily objevy u množství dalších rostlinných druhů. Na počátku 70. let byla androgeneze potvrzena jen u o něco více nežli 20 druhů, včetně několika různých variant a druhů tabáku (Sunderland, 1971). Do roku 1982 však bylo publikováno přes 500 článků potvrzujících různá dosažená stádia androgeneze u 171 druhů patřících do 60 rodů (Maheshwari et al., 1982). Zároveň probíhaly snahy o zefektivnění protokolů tam, kde již byl vznik embryí z pylu potvrzen, případně vznik kalusu a z něj následná regenerace rostlin. Vznikalo množství nových metod a způsobů ošetření rostlin, což aspoň u některých druhů vedlo k vyšší úspěšnosti při získávání haploidních rostlin (viz kap. Metody).

Vědci si již tenkrát uvědomovali, jaký potenciál získané haploidní rostliny ukrývají. Pokud by se je podařilo získat s dostatečným výtěžkem a následně je přimět k endoreduplikaci genomu, získali by v krátkém čase velké množství 100% homozygotních rostlin, též nazývaných dihaploidní (DH). Takovéto rostliny by pak byly ideální pro šlechtění, často by se ušetřily roky křížení ve snaze získat homozygotní rostliny. Zvlášť velký význam by byl u komerčně pěstovaných plodin, například obilnin (viz kap. Význam). Zároveň se však projeví komplikace s tím spojené. Výtěžky byly přes veškeré snahy stále malé, nedařilo se získat haploidní rostliny významných plodin, případně byly vzniklé rostliny neživotaschopné *ex-vitro* (viz kap. Problémy).

V průběhu osmdesátých a devadesátých let nastal jistý útlum. Výzkum sice stále probíhal, nicméně množství publikovaných článků a nových poznatků bylo oproti bouřlivějším sedmdesátým létům spíše menší. Trochu paradoxně však v tuto dobu zřejmě došlo ke zdokonalení mikrosporových kultur. Zatímco na počátku osmdesátých let představovaly teprve vyvíjející se metodu plnou různých komplikací (Maheshwari et al., 1980), koncem devadesátých let se již u některých rostlin používala celkem běžně bez větších problémů (např. Hause et al., 1994; Touraev et al., 1997).

Větší zájem o fenomén androgeneze se znovu vrátil teprve poměrně nedávno, možná i díky rozvoji nových technologií a vědních disciplín. V roce 2003 vyšla kniha shrnující metody tvorby haploidních rostlin pravděpodobně u většiny druhů, kde již byl vznik haploidů v té době potvrzen (Maluszynski et al., 2003), převážná část je však věnována plodinám. Bylo jich něco přes 200, vývoj tedy převážně směřoval (a pravděpodobně stále směřuje) spíše nežli cestou objevování nových potenciálně využitelných druhů cestou zdokonalování protokolů tam, kde produkce již byla možná a homozygotní rostliny jsou žádané.

### **3. Metody**

#### **3.1 Postup**

Pokud chceme nějakým způsobem využít rostliny androgenního původu, je vhodné nejprve vědět, jak a zda vůbec je možné je získat. Možných postupů je přitom několik. Nejpůvodnějším postupem je prašnicková kultura a z ní se pak časem odvodila kultura izolovaných mikrospor či pylových zrn. Tyto metody se dají souhrnně nazvat jako přímé. Mimo to existují ještě metody nepřímé, kdy nezískáme pylová embrya, nýbrž kalus. Každý z těchto postupů má své výhody a nevýhody.

### 3.1.1 Prašníková kultura

Prašníková kultura představuje poměrně jednoduchý a zároveň první objevený postup, pomocí kterého bylo možno získat androgenní embrya. Základní protokol prašníkové kultury pochází od indických vědců (Guha and Maheshwari, 1964). Brzy se však dočkal množství nejrozličnějších úprav a vylepšení od různých autorů, včetně samotných objevitelů, ve snaze získat buď větší množství embryí, nebo získat embrya u dalších druhů rostlin. V některých úpravách se používá i dnes. Nově byla takto získána například haploidní cizrna beraní (*Cicer arietinum*, Abdollahi and Rashidi, 2018).

V základním postupu pro kultivaci prašníků se sterilizují celá uříznutá poupata ve vhodném vývojovém stádiu (viz kap. Vývojové stádium pylu). Ke sterilizaci se obvykle používají roztoky různých sloučenin chloru. Následně se poupě otevře a sterilně se vyjmou prašníky, které se umístí na příslušné kultivační médium (viz kap. Složení médií). Je vhodné, aby kontakt prašníků s médiem byl co nejintenzivnější (Sopory and Maheshwari, 1976). Zároveň by se během manipulace neměla porušit stěna prašníků a někteří autoři proto hned po umístění prašníků na médium odstraňují nitku, pokud je to možné (např. Rashid and Street, 1973), protože její přítomnost jinak může vést ke vzniku nežádoucího kalusu z diploidních pletiv. V jiných případech ale přítomnost nitky či dalších květních částí příliš nevádí (Sunderland and Dunwell, 1977). Následně se prašníky kultivují při vhodné teplotě a osvětlení (viz kap. Kultivační podmínky) po dobu až několika týdnů, kdy se mohou objevit první embrya.

Existuje řada modifikací tohoto základního protokolu. Často se používá například chladové předpůsobení na celá poupata předcházející samotnou kultivaci (viz kap. Ošetření před kultivací). Další možnou modifikací může být třeba rozlišení indukčního a kultivačního média nebo častá subkultivace.

Na pomezí mezi prašníkovou kulturou a kulturou izolovaných pylových zrn stojí metody, kdy se po krátké kultivaci prašníků pylová zrna buď izolují, nebo se záhy samovolně uvolní. Krátká indukce prašníků před izolací může poskytovat lepší výnosy, nežli samotná prašníková kultura nebo mikrosporová kultura (např. Reinert et al., 1975). Ošetření lze také kombinovat či nahradit působením chladu na celá poupata (více viz kap. Ošetření před kultivací).

Jinou metodou je kultivace prašníků na hladině tekutého média. Z prašníků se poté samovolně uvolní pylová zrna, která jsou dále kultivována volně rozptýlena v médiu (např. Supena et al., 2006). V kombinaci s například chladovým předošetřením lze pak opět získat vyšší výnosy.



### **3.1.2 Kultura izolovaných mikrospor**

Mimo kultivace celých prašníků je také možná kultivace izolovaných mikrospor či pylových zrn. V ideálním případě tento způsob přináší několik výhod (shrnuje např. v Ferrie and Caswell, 2011). Předně se eliminuje možná kontaminace haploidních embryí diploidním pletivem ze stěn prašníků. Dále vyvíjející se embrya nejsou omezena malým prostorem v prašníku plném množstvím dalších pylových zrn a embryí a také se odstraní případný negativní vliv možných inhibitorů z prašниковých stěn. Kultivace izolovaných mikrospor konečně také umožňuje přesnější studium, jak vývoj embryí z pylu vlastně probíhá.

Nicméně hned zpočátku bylo zjištěno, že praktické provedení rozhodně není snadné. Zdá se, že je třeba nahradit veškeré nezbytné látky, které pylová zrna z prašníků v prašnikovách kulturách získávají. Nitsch and Norreel (1973) k tomu například použily odvar z prašníků.

S dalším výzkumem, hlavně stresových odpovědí, se však ukázalo, že kultivace izolovaných pylových zrn nemusí představovat neřešitelný problém. S použitím vhodného stresového ošetření lze u některých rostlin indukovat pylovou embryogenezi i u izolovaných mikrospor (např. Touraev et al., 1997), aniž by bylo nezbytné použít nějaké obzvlášť složité médium. Běžně používané protokoly obvykle zahrnují izolaci pylových zrn, indukci embryogeneze pomocí stresového ošetření (případně v opačném pořadí), kultivaci a regeneraci embryí či semenáčků.

K separaci mikrospor bývá vhodné využití centrifugace. Často se používá například v percollovém gradientu (Touraev et al., 1996b), nebo v hustotním gradientu sacharózy (Maraschin et al., 2003) či maltózy (Kasha et al., 2001b). Mimo izolaci mikrospor představuje centrifugace sama o sobě potenciální stresor ovlivňující například asymetričnost první pylové mitózy, který může zvýšit pylovou embryogenezi. Též je možné na základě pylového dimorfismu oddělit potenciálně embryogenní pyl od neembryogenního. Ač se zdá, že pylový dimorfismus může být přítomen již na neošetřené mateřské rostlině a nemusí tedy představovat rozdíl v morfologii a vlastnostech embryogenního a neembryogenního pylu, rozdělením těchto odlišných pylových zrn lze získat frakci s mnohem vyšší frekvencí tvorby pylových embryí (Touraev et al., 1996b).

### **3.1.3 Nepřímá androgeneze**

Nežádá se stává, že pylovou embryogenezi, alespoň prozatím, nelze indukovat přímo. Nicméně za určitých podmínek se daří indukovat aspoň buněčné dělení a zformování kalusu. Z něj pak může být možné indukovat embryogenezi sekundárně (např. Abdollahi and Rashidi,

2018), mnohem častěji se však rostlina regeneruje organogenezí. Působením růstových regulátorů (v tomto případě cytokininů) se nejprve indukuje tvorba prýtu, a poté se explantát přesadí na médium bez hormonů, aby vytvořil kořeny. Takto byl získán například první haploidní houseníček thalův (*Arabidopsis thaliana*, Gresshoff and Doy, 1972) nebo nově aktinidie význačná neboli kiwi (*Actinidia arguta*, Wang et al., 2018).

Ač se nejedná o pylovou embryogenezi v pravém slova smyslu, výchozí materiál i význam takto získaných rostlin je velmi podobný. Oproti přímým metodám má však několik nevýhod. Použití stádia kalusu v explantátových kulturách obecně s sebou nese rizika změn genetické informace. Může docházet k různým změnám v počtu chromozomů – aneuploidiím, polyploidiím, případně mixoploidiím atd. Riziko bývá tím větší, čím déle trvá kultivace ve stádiu kalusu (Santos-Serejo and Aguiar-Perecin, 2016). Obdobné následky může mít i použití např. mitotických jedů jako je kolchicin (Martin and Widholm, 1996). Prakticky též může být nemožné získat haploidní rostlinu, případně jen s velmi malou frekvencí (např. u kiwi Wang et al., 2018, ač zde je to též dáno variabilní ploidií výchozího materiálu). Pokud je možné získat rostlinu přímou embryogenezí, od nepřímé androgenese se spíše ustupuje. Nicméně pokud nám jde pouze o produkci homozygotních dihaploidů a nepotřebujeme přímo haploidní rostliny, tento postup může být dostačující.

### **3.2 Faktory ovlivňující pylovou embryogenezi**

Na průběh pylové embryogeneze má vliv množství nejrozličnějších faktorů – od variabilních vlastností výchozího materiálu přes jeho stáří a fyziologický stav, způsob ošetření až po fyzikální faktory v průběhu kultivace.

#### **3.2.1 Složení médií**

Média a jejich složení jsou nezbytnou součástí všech metod využívajících *in vitro* technik. Jako základ se často používají média navržená pro tkáňové kultury, běžné bývá MS médium (Murashige and Skoog, 1962), případně starší Whitovo médium (White, 1954). Tato média obsahují základní minerální živiny nezbytné pro růst a vývoj rostlin, například zdroje dusíku nebo fosforu ve vhodné formě. Dále pak obsahují některé organické sloučeniny, hlavně vitamíny. Zdrojem uhlíku a energie bývá zpravidla sacharóza a médium může být ztuženo agarem.

Podobné složení má i Nitschovo médium (Nitsch and Nitsch, 1969), které bylo navrženo přímo pro kultivaci prašníků a indukci pylové embryogeneze. Samotná indukce zřejmě

nevyžaduje příliš složité médium. Nejjednodušší médium, na kterém byla úspěšně indukována pylová embryogeneze, obsahovalo pouze sacharózu a agar (Nitsch, 1969), nicméně vývoj embryí se zastavil v globulárním stádiu. Pro další vývoj je zdůrazňována nezbytnost zdroje železa, obvykle v chelatované formě.

Základní média bývají často upravována. Někdy může být vhodné manipulovat s koncentracemi jednotlivých minerálních živin, pokud má daná rostlina specifické požadavky. Častěji se však přidávají například různé růstové regulátory, nejčastěji auxiny, cytokininy, případně gibbereliny, které mohou mít pozitivní vliv na průběh embryogeneze či regeneraci rostlin. Běžně se používá například syntetický auxin kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D, např. (Abdollahi and Rashidi, 2018), v některých případech však paradoxně použití anti-auxinu (například PCIB) může zvýšit výtěžek embryí (Agarwal et al., 2006). Pozitivní vliv na průběh mikrosporové embryogeneze může mít i kyselina abscisová (ABA, Ahmadi et al., 2014), jež se podílí hlavně na stresové odpovědi (shrnutí v Cutler et al., 2010).

Hlavně zpočátku se do médií přidávaly také komplexní, špatně definovatelné složky přírodního původu jako je kokosová voda (použili již Guha and Maheshwari, 1964), hydrolyzát kaseinu, kvasnicový extrakt nebo šťáva z různých plodů. Velmi brzy se však objevily snahy zjistit, které konkrétní molekuly jsou pro vznik embryí nezbytné, které mohou být prospěšné a které lze z médií naopak eliminovat. Od těchto komplexních složek se tedy spíše upouští a používají se jen zřídka.

Zajímavý efekt na indukcii androgenese má kultivace mikrospor na médiu společně s vajíčky (Lantos et al., 2009), případně na médiu jimi předpůsobeném (Zheng et al., 2002). Pozitivní efekt může mít též kultivace mikrospor na médiu, které bylo předpůsobeno pomocí aktivně rostoucích mikrosporových kultur jiného, často dobře indukovatelného rostlinného druhu (Sidhu and Davies, 2009). Předpokládá se, že aktivně rostoucí kultury uvolňují do média nějaké signální molekuly podporující indukcii buněčného dělení, ač přesný mechanismus účinku zatím není znám.

Přidání agaru do média není nezbytné. Samotný agar je v podstatě rostlinného původu, a pokud není dostatečně čistý, může obsahovat látky, které mohou negativně ovlivnit vývoj pylových embryí i jiných rostlinných explantátů. Byly potvrzeny případy, kdy kultivace prašníků na hladině tekutého média zvýšila tvorbu embryí oproti kultivaci v identických podmínkách na agarem ztuženém médiu (např. u tabáku - Wernicke and Kohlenbach, 1976). Mimo možné přítomnosti inhibitorů v agaru se předpokládá i usnadnění difuze potenciálních inhibičních látek uvolňujících se ze samotných prašníků.

Lepších výsledků se také dosáhlo přidáním aktivního uhlí do média. Díky svým adsorbčním vlastnostem může aktivní uhlí vyvázat nežádoucí inhibitory přítomné v médiu a několikanásobně tak zvýšit množství získaných embryí (Anagnostakis, 1974). Řešením může být také použití čistších (ale zároveň dražších) forem agarů či agarózy (Kohlenbach and Wernicke, 1978). Použití aktivního uhlí v tekutém médiu má ale naopak spíše inhibiční účinek a výtěžek snižuje (Wernicke and Kohlenbach, 1976). Také může kromě potenciálních inhibitorů vázat též růstové regulátory či jiné komponenty médií (Weatherhead et al., 1978). Aktivní uhlí se však stále používá i v některých recentních protokolech (např. Copetta et al., 2018).

Jako zdroj uhlíku v médiu se často používá sacharóza, nejčastěji v koncentraci kolem 2-3 %. V některých případech však může být pro indukci embryogeneze, zvláště u mikrosporových kultur, vhodné použít i 10% a více (osmotický stress – např. Lichter, 1982), nebo zdroj uhlíku v indukční fázi naopak úplně vynechat. Pak se jedná o stres hladověním (Touraev et al., 1996b). Alternativním způsobem může být též použití pro daný rostlinný druh nemetabolizovatelného sacharidu. Často se používá například mannitol (Munoz-Amatriain et al., 2006).

### **3.2.2 Genotyp**

Podstatným faktorem ovlivňujícím androgenezi je genotyp. Tento efekt byl patrný již téměř od počátku výzkumu, kdy se vědci pokusili indukovat pylovou embryogenezi u několika blízce příbuzných druhů nebo u různých kultivarů téhož druhu. Například J. P. Nitsch (1969) se pokusil o indukci embryogeneze u 12 druhů tabáku (*Nicotiana*), úspěšný byl ale jen u pěti z nich. O něco později bylo na jednom z testovaných médií možné získat kalus pouze u jediného z dostupných genotypů indické rýže (Lentini et al., 1995) a celkově bývá množství regenerovaných rostlin nižší oproti japonským variantám.

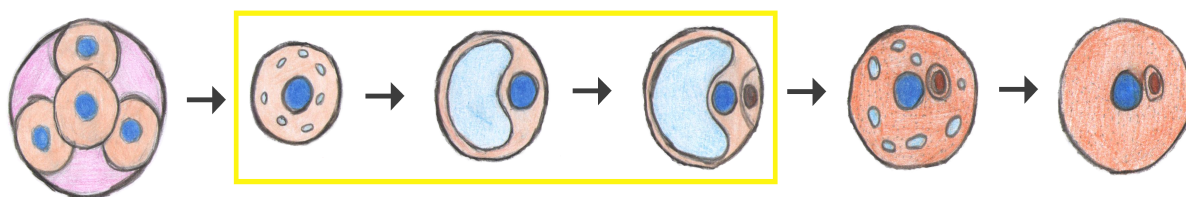
Nelze však absolutně říci, že u některých variet je androgeneze nemožná. Při jistém ošetření nemusí být buněčné dělení u pylových zrn vůbec pozorováno, ale při použití vhodnějších metod může být možné získat životaschopné semenáčky. Například Amos a Scholl (1978), ač s použitím nepřímé androgeneze, úspěšně regenerovali haploidní semenáčky houseníčku u některých linií, u kterých to předtím nebylo možné (Gresshoff and Doy, 1972). Znamená to však, že je často třeba vypracovat speciální protokol pro každý rostlinný druh i pro různé varianty téhož druhu.

U některých špatně indukovatelných, rostlinných druhů či variant, případně u druhů, kde obtížně dochází k regeneraci rostlin, se předpokládá přítomnost množství recesivních letálních genů. Tyto problémy zřejmě souvisí též s imbrední depresí. Například u pšenice jsou k indukci

pylové embryogeneze a k regeneraci životaschopných semenáčků zřejmě potřebné D chromozomy (Lazaridou et al., 2016), což je v rámci historie kulturní pšenice „nejnovější“ součást genomu. Bez těchto chromozomů se tvoří mnohem méně embryí a žádné z nich se nepodařilo regenerovat v zelené semenáčky.

### 3.2.3 Vývojové stádium pylu

Embrya z pylu je u různých druhů možné získat od stádia pylové tetrády přes jednobuněčné mikrospory až po časně stádium dvojbuněčného pylu. U tabáku byla s použitím různých metod získána embrya ze všech těchto vývojových stádií: ze stádia pylové tetrády v japonské laboratoři (Nakata and Tanaka, 1968), z mikrospor ve francouzské laboratoři (Nitsch, 1969), a v anglické laboratoři z mikrospor i z časněho dvojbuněčného pylu (Sunderland and Wicks, 1971). Embryogeneze z pylových zrn v tetradě však nebývá příliš častá a nejčastěji se používá právě mikrospor nebo časněho dvojbuněčného pylu. Tato stádía bývají často nejvhodnější a v závislosti na použité metodě mívají nejvyšší výtěžky.

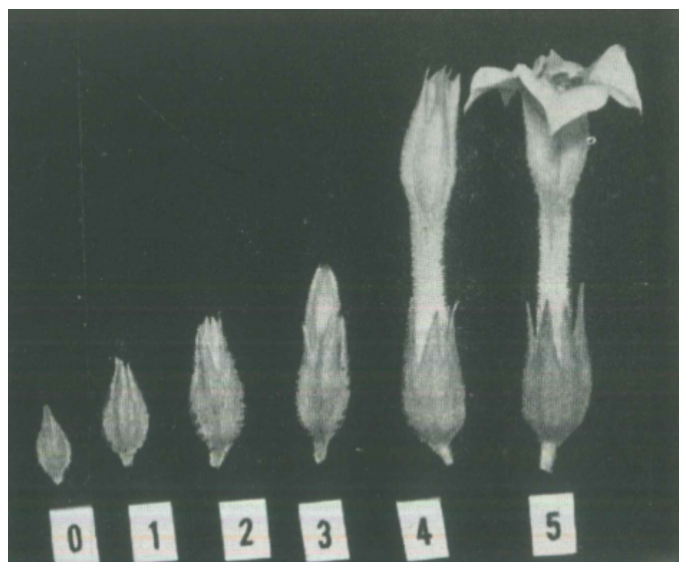


Obrázek 2: Jednotlivá vývojová stádía pylových zrn, vyznačená stádía jsou nejvíce vhodná k indukci androgeneze

Limitujícím faktorem ve vývoji pylu, kdy většinou již nelze indukovat pylovou embryogenezi, bývá akumulace škrobu. Pylová zrna obsahující v době indukce embryogeneze větší množství škrobu jej převážně dále hromadí a embrya většinou netvoří (Rashid and Street, 1973). Výjimku tvoří zřejmě pyl brukve zelné, kde lze dělení indukovat i u téměř zralého pylu (Kameya and Hinata, 1970, Sunderland, 1971). Zároveň se však pylová zrna u tohoto rostlinného druhu liší od většiny ostatních používaných rostlin tím, že jsou v době dozrání v prašnicích trojbuněčná.

V praxi je též vhodné vědět, kdy se se pylová zrna nacházejí v požadovaném vývojovém stádiu. Otvírání jednotlivých poupat a prašníků a mikroskopické pozorování pylových zrn v každém z nich je značně pracné, tudíž se hledaly jednodušší metody. Nitsch (1969) třeba zjistil, že u tabáku je značná korelace mezi vývojovým stádiem květu a pylových zrn. Indiští vědci u durmanu potvrdili vztah mezi vývojovým stádiem pylu a velikostí prašníku, nicméně velikost poupěte a prašníků si ne vždy odpovídá (Sopory and Maheshwari, 1976). Často se tedy k velikosti a vývojovému stádiu poupěte přihlíží (udává se například velikost poupěte a srovnání

délky kališních a korunních lístků), ač někdy bývá vhodné použití i jiné metody k ověření přesného vývojového stádia pylových zrn. V některých případech se třeba pylová zrna z jednoho nebo několika málo prašníků z každého květu pozorují pod mikroskopem, aby se správné vývojové stádium pylu ověřilo (např. Copetta et al., 2018).



Obrázek 3: Stádia vývoje květu u tabáku (*N. Tabacum*). Upraveno podle Nitsch 1969.

Vývojové stádium pylu má kromě úspěšnosti androgeneze a množství získaných embryí ještě další vliv. Embrya a semenáčky získané z mladších vývojových stádií (obvykle jednobuněčných) bývají častěji haploidní, zatímco u starších pylových zrn se častěji vyskytují vyšší ploidie. Toto bylo potvrzeno například u durmanu (Engvild et al., 1972), tabáku (Engvild, 1974) nebo petunie (*Petunia axillaris*, Engvild, 1973), ač zastoupení vyšších ploidií se mezi jednotlivými rostlinnými druhy liší. Zatímco tabák tvoří převážně haploidní embrya, petunie jsou téměř výhradně triploidní.

### 3.2.4 Ošetření před kultivací

Ošetření prašníků nebo celých poupat před samotnou kultivací může mít pozitivní vliv na průběh pylové embryogeneze a zvýšit množství získaných embryí. Často se používá chladové ošetření, kdy se čerstvě odstraněná květní poupata nechají při teplotě převážně kolem 3-5 °C po dobu několika dní. Doba ošetření a přesná teplota se často liší protokol od protokolu, Colette Nitsch (1974) například před izolací pylových zrn nechala poupata tabáku při 5 °C po dobu 48 hodin, v jiném případě, Tyagi et al. (1979) ošetřili poupata durmanu 4 °C po dobu 4 dní. U indické rýže se ukázalo nejvhodnější ošetření při 10 °C po dobu 8-10 dní (Mishra et al. 2013). Nejvhodnější vývojové stádium pylu k chladovému ošetření je zřejmě těsně před první pylovou mitózou (např. Tyagi et al., 1979; Zapata-Arias, 2003). Použití chladového ošetření se v některých případech ukázalo prakticky nezbytné před kultivací izolovaných pylových zrn (Nitsch and Norreel, 1973).

### **3.2.5 Kultivační podmínky**

Vliv na průběh embryogeneze mají rozhodně také podmínky, při kterých se prašníky nebo izolovaná pylová zrna kultivují. Podstatným faktorem je teplota v kultivační místnosti. Experimenty u durmanu ukázaly, že pro úspěšnou embryogenezi je optimální teplota kolem 25 - 30 °C (Sopory and Maheshwari, 1976). Při nižších teplotách produkce embryí prudce klesá, pokud vůbec nějaká embrya vzniknou. Podobné požadavky má i tabák (Sunderland, 1971), pšenice (Barnabas, 2003) a zřejmě i většina ostatních rostlinných druhů. V některých případech může být prospěšné kultivovat prašníky nejprve při vyšší teplotě a po několika dnech až týdnech teplotu snížit, například u řepky (Pechan et al., 1991).

Jistý benefiční účinek může mít i osvětlení, ač pro samotnou indukci zřejmě není nezbytné. Asi nejčastěji používané a vhodné pro většinu druhů je střídání period osvětlení a period tmy, i když konkrétní fotoperioda se často liší mezi jednotlivými protokoly. Někdy může být vhodné provést kultivaci aspoň prvních několik dní po tmě (Pechan et al., 1991) a až při regeneraci rostlin přenést kultury pod osvětlení s určitou fotoperiodou. Kultivace při nepřetržitém osvětlení se však zdá spíše inhibiční (Sopory and Maheshwari, 1976).

Další kultivační podmínky, jako je pH média, jsou zřejmě obdobné jako u jiných explantátových kultur, ač někdy může mít vyšší pH pozitivní vliv na indukci embryogeneze (Barinova et al., 2004).

### **3.2.6 Fyziologický stav mateřské rostliny**

Jako u jiných *in vitro* kultur, vliv na pylovou embryogenezi má i fyziologický stav mateřské rostliny, ze které byl výchozí materiál odebrán a podmínky, při kterých rostla. Někdy bývá vhodné pro lepší odpověď na indukci pylové embryogeneze pěstovat rostlinu před odebráním materiálu několik dní při určité teplotě, například u jednoho druhu tabáku (*Nicotiana knightiana*) se ukázala být vhodná spíše vyšší teplota (20-30 °C, Sunderland and Dunwell, 1977). U jiných rostlinných druhů může naopak mít pozitivní účinek pěstování mateřské rostliny při nižších teplotách, pro zimní odrůdu ječmene setého (*Hordeum vulgare*) je ideální teplota kolem 12 °C (Kasha et al., 2003). Dalším faktorem je fotoperioda, pylová zrna někdy poskytují větší množství embryí, pokud se mateřská rostlina pěstuje při krátkém dni (např. Heberle-Bors and Reinert, 1979). Vliv může mít i dostupnost živin. V některých případech byly pozovány lepší výtěžky, pokud měla mateřská rostlina živin dostatek (Heberle-Bors and Reinert, 1979), nicméně může tomu být i obráceně.

Jisté rozdíly v úspěšnosti androgeneze byly pozorovány i mezi jednotlivými květy v rámci celých květenství, respektive u rostlin různého stáří. V některých případech jsou prašníky z prvních poupat vhodnější a výtěžky embryí jsou o něco vyšší nežli u prašníků sklizených z později vytvořených poupat. Toto bylo pozorováno například u tabáku (Anagnostakis, 1974, Sunderland, 1971), u rulíku zlomocného (*Atropa belladonna*, Rashid and Street, 1973) nebo u rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*, Shtereva et al., 1998). Předpokládá se, že se stářím rostliny se může snižovat životaschopnost pylu, což bylo v jiné souvislosti pozorováno například u hluchavkovitých rostlin ožanky (*Teucrium capitatum*), majoránky syrské (*Origanum syriacum*, (Rodríguez-Riaño and Dafni, 2007) či klasnatky (*Elsholtzia rugulosa*, (Zhang and Wolfe, 2016). V jiných případech však žádný rozdíl pozorován nebyl (Johansson and Eriksson, 1977).

### 3.3 Tvorba dihaploidních rostlin

Rostliny získané pylovou embryogenezí bývají obvykle haploidní a tudíž i sterilní. Aby bylo možné využít rostliny k dalšímu křížení, je nutné obnovit jejich fertilitu. Toho lze dosáhnout endoreduplikací genomu do diploidního stavu. Vzácně k tomu i dochází spontánně, ač u některých rostlinných druhů může být regenerace spontánních diploidů poměrně častý jev. Pro praktické využití ostatních rostlin je nicméně vhodné duplikaci genomu indukovat (shrnutí například v Castillo et al., 2009). Asi nejznámějším způsobem je použití kolchicinu, což je mitotický jed, který brání správné funkci dělicího vřeténka a rozchodu chromozomů během mitózy. Vhodnou fází pro aplikaci kolchicinu jsou spíše časná vývojová stadia, která mají malý počet pravidelně se dělících buněk. Pokud necháme kolchicin působit právě po dobu jednoho celého buněčného cyklu ve všech buňkách, dojde ke zdvojení množství DNA v jádře a získáme diploidní rostliny. V praxi ale také často dochází ke vzniku různých aneuploidií, případně se ploidie v rámci jednotlivých částí rostliny může lišit (Martin and Widholm, 1996).

Jinou možnou metodou je kalogeneze a následná organogenezene (Nitsch et al., 1969). Na části haploidní rostliny se indukuje tvorba kalusu. Ten se poté po nějakou dobu subkultivuje, než se opět indukuje organogeneze, případně embryogeneze, a regeneruje se celistvá rostlina. Vzniklé rostliny pak mohou být diploidní. Zřejmě je to dáno jistou genetickou nestabilitou kalusu, kdy často dochází ke spontánním změnám v genomu, podobně jako po působení kolchicinu (např. Santos-Serejo and Aguiar-Perecin, 2016).



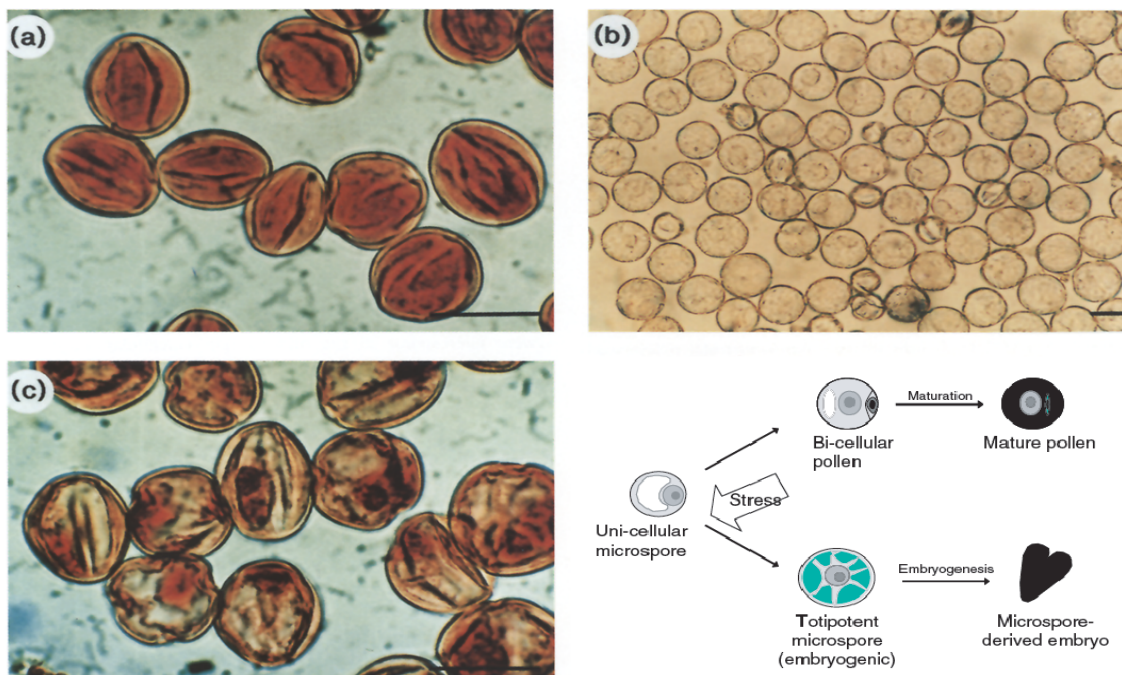
## **4. Průběh vývoje pylových embryí**

Vývoj pylových embryí se dá rozdělit do několika částečně se překrývajících fází (Maraschin et al., 2005b). V první fázi musí nezralé pylové zrna získat embryogenní potenciál. Pomocí stresu dochází k inhibici vývojového programu zodpovědného za diferenciaci ve zralý gametofyt a namísto toho se spustí alternativní cesta vedoucí k tvorbě sporofytu. V této fázi je často zvýšená exprese genů stresové odpovědi. Též se rozhoduje o průběhu prvního buněčného dělení (pokud již neproběhlo) a v závislosti na tom se jednotlivé buňky mohou ale nemusejí podílet na vývoji budoucího embrya. V druhé fázi dochází k iniciaci buněčného dělení a tvorbě mnohobuněčných struktur, stále uzavřených v exině. Na iniciaci této fáze se již podílejí regulační geny většího účinku. V třetí fázi pak dochází k prasknutí exiny, uvolnění masy buněk a následné diferenciaci v embrya podobnou cestou, jako u embryí zygotických. Na přechodu mezi druhou a třetí fází se zřejmě stanoví budoucí polarita embrya.

### **4.1 Morfologické znaky a polarita embryogenních pylových zrn**

Při indukci pylové embryogeneze byly často hledány znaky, pomocí kterých lze v časně fázi indukce rozlišit embryogenní pylová zrna od neembryogenních. Výrazným morfologickým znakem (ač nemusí být přítomen u všech druhů) je tzv. hvězdu připomínající struktura (z angl. star-like structure, (Touraev et al., 1996a), kdy se jádro nachází ve středu buňky obklopeno provazci cytoplasmy a fragmentovanou vakuolou. Oproti neembryogennímu pylu tato zrna obsahují jen minimum škrobových zrn (viz Obrázek 4).

Zatímco u zygotického embrya se polarita embrya určuje již před prvním buněčným dělením zygoty, u pylových embryí se tak děje zřejmě až v době kolem prasknutí exiny a uvolnění globulární masy buněk. Experimenty u řepky (Hause et al., 1994) ukázaly, že v místě prasknutí exiny vzniká později apikální meristém a dělohy, zatímco na opačném pólu se diferencuje budoucí základ kořene. U ječmene (Maraschin et al., 2005a) samotné prasknutí exiny zřejmě předchází programovaná buněčná smrt generativní buňky nebo jejích derivátů, nacházejících se na tomtéž místě. Další vývoj proembrya je pak velice podobný zygotické embryogenezi – od globulárního stádia přes srdčité a torpédovité až po zralé embryo. Vzhledem se od zygotického embrya liší pouze variabilním počtem děloh, kterých může být třeba i deset (pozorovali již Guha and Maheshwari, 1964) nebo mohou mít abnormální tvar (Nitsch, 1969). Některá pylová embrya dokonce mají i struktury podobné suspensoru (Hause et al., 1994).



Obrázek 4: **a** - pylová zrna tabáku na počátku kultivace, **b, c** - po 6 dnech, **a, c** – škrobová zrna obarvena acetokarmínem. Upraveno podle Touraev et al., 1996a, schéma Shariatpanahi et al. 2006.

## 4.2 Původ pylových embryí

Cest vedoucích ke vzniku embryí z pylových zrn je možných hned několik. Různé možnosti průběhu prvních buněčných dělení a z nich následný vznik pylových embryí byly popsány již dříve (Sunderland and Evans, 1980), poměrně recentně však byly všechny dosud známé cesty pozorovány s různou frekvencí u mikrospor ječmene (Daghma et al., 2014). Prvním možným způsobem průběhu pylové embryogeneze je indukce jednobuněčných mikrospor. Mitóza následně probíhá symetricky a vznikají dvě podobná jádra, která se pak rovnocenně podílí na vzniku embrya. U druhé varianty probíhá první buněčné dělení asymetricky a vznikají dvě odlišné buňky. Větší vegetativní buňka poté pokračuje v dělení a dává vzniknout budoucímu embryu. Menší generativní buňka se může až několikrát rozdělit, nicméně její deriváty většinou zanikají. Ač v některých případech byly deriváty generativní buňky pozorovány živé i v pozdějších fázích tvorby mnohobuněčných struktur, jejich podíl na tvorbě embryí se vzhledem k rozdílnému stavu jaderného chromatinu spíše nepředpokládá.

Jaderné fúze jsou zřejmě poměrně častý jev (Daghma et al., 2014), který se může udát v jakékoliv fázi vývoje pylových embryí. K opětovné fúzi jader může dojít například pokud selže následná cytokineze nebo tvorba buněčné stěny (např. Kasha et al., 2001a). Zatímco fúze jader v časně fázi vývoje dává vznik spontánně diploidním embryím, při fúzích v pozdějších fázích mohou vznikat chimérické rostliny.

S různou frekvencí se jednotlivé cesty zřejmě mohou vyskytovat u i většiny ostatních rostlinných druhů a v závislosti na druhu a typu stresu použitém k indukci embryogeneze některá z nich převažuje (Touraev et al., 1997). Často může také za daných podmínek jedna cesta vést ke vzniku životaschopného embrya, zatímco u alternativní cesty se vývoj v určitém stádiu zastaví (Maraschin et al., 2005a).

### **4.3 Genetická regulace**

Během pylové embryogeneze musí dojít k represí programu diferenciaci ve zralé pylové zrno a zároveň se musí aktivovat alternativní cesta vedoucí ke vzniku embrya. Toto je spojeno i se změnami ve hladinách exprese jednotlivých genů. Některé se při přepnutí cesty na vznik embrya přepisují a překládají méně a jiné naopak více. Genová exprese se též liší mezi časnou a pozdní fází indukce embryogeneze a regenerace embryí. Zatímco na počátku se přepisují hlavně geny specifické spíše pro stresové odpovědi, v pozdějších fázích se jedná o regulátory genové exprese specifické pro embryogenezi.

#### **4.3.1 Časná fáze indukce embryogeneze**

Jedny z prvních genů, jejichž exprese se zvýší již během indukce embryogeneze, bývají geny stresové odpovědi. Často to bývají například geny chránící buněčnou strukturu, jako jsou proteiny tepelného stresu (angl. heat shock proteins, HSP), pokud byla embryogeneze indukována tepelným šokem (předpokládá např. Pechan et al., 1991), nicméně v jiných případech jejich zvýšená exprese není nezbytná (Zhao et al., 2003).

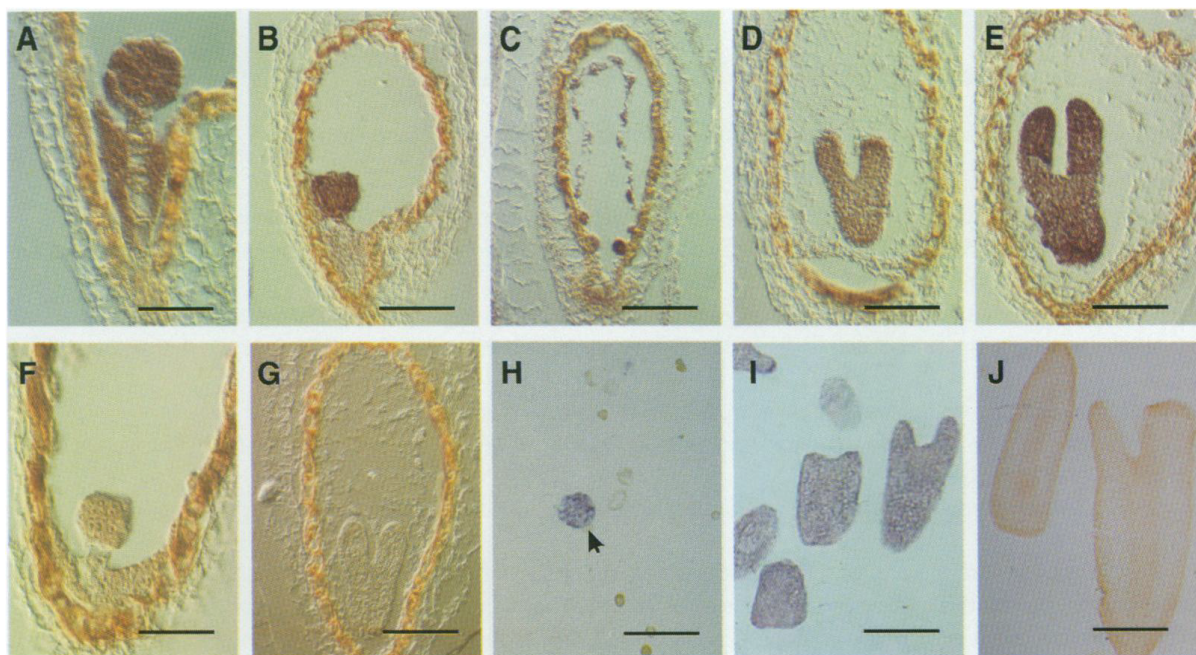
Dalšími geny mohou být proteolytické geny, jejichž exprese vede k degradaci pylově specifických proteinů a k reutilizaci komponent. Proteomické analýzy ukázaly, že v časně fázi indukce embryogeneze dochází ke změnám v proteomu (např. Pechan et al., 1991). V embryogenním pylu se objevují proteiny, které se ve stejně starém neembryogenním pylu nevyskytují buď vůbec, nebo jen v minimální míře, jiné proteiny naopak mizí. Zároveň u embryogenních mikrospor dochází k celkovému snížení komplexity proteomu. Předpokládá se, že se může jednat o dediferenciaci buněk v důsledku inhibice diferenciaci ve zralá pylová zrna. Převážně pylově specifické proteiny se přitom zřejmě nadále nesyntetizují, což potvrzují i pozdější analýzy transkriptů (Maraschin et al., 2006), nebo jsou degradovány aktivitou proteáz.

Mimo primární degradace proteinů specifických pro zralý pyl a dediferenciace buněk hrají proteázy v průběhu pylové embryogeneze ještě další role. Některé se například podílejí na regulaci buněčného cyklu (např. Genschik et al., 1998). Pro úspěšnou regeneraci zelených rostlin

je zřejmě nezbytná i plastidová proteáza FtsH, podílející se na degradaci poškozených částí fotosystémů (Yu et al., 2004).

#### 4.3.2 Regulátory genové exprese

Naprostou klíčovou úlohu hrají při přepnutí vývojových drah regulátory genové exprese, zejména transkripční faktory. Jedním z významných regulačních genů se zvýšenou expresí v průběhu embryogeneze je *BABY BOOM* (*BBM*, Boutilier et al., 2002). Jedná se o transkripční faktor obsahující DNA vazebnou doménu nazývanou AP2, jenž je velmi podobná doménám u proteinů z rodiny AP2/ERF (od *APETALA2* a *ETHYLENE RESPONSE FACTOR*). Tato rodina se dá rozdělit do dvou podrodin (Moose and Sisco, 1996; Zhou et al., 1997) v závislosti na počtu DNA vazebných domén. Zatímco proteiny v podrodině ERF obsahují pouze jednu DNA vazebnou doménu a obecně se podílejí spíše na regulaci odpovědi na různé stresy (např. Stockinger et al., 1997; Zhou et al., 1997), podrodina AP2 má DNA vazebné domény dvě a její členové se uplatňují se v regulaci vývoje orgánů (např. Moose and Sisco, 1996; Chuck et al., 1998).



Obrázek 5: Exprese *BBM* (hnědé či fialové zabarvení) v zygotickém embryu houseníčku (A-G) a v mikrosporovém embryu řepky (H-J). Převzato z Boutilier et al., 2002.

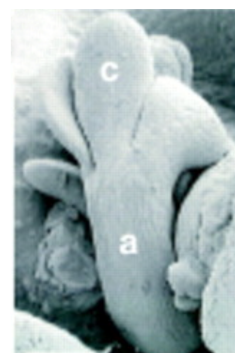
Protein *BABY BOOM* se přirozeně vyskytuje ve vyvíjejících se semenech, včetně embryí. Byl například detekován ve volném jaderném endospermu, nicméně s jeho celularizací se exprese dramaticky snížila (Boutilier et al., 2002). Dále byla jeho přítomnost potvrzena v embryogenních pylových zrnech řepky již několik dní po indukci, zatímco u stejně starých, ale neembryogenních zrn chyběl. Je tedy zřejmé, že se podílí na diferenciaci embryí. Toto potvrzují i experimenty s geneticky modifikovanými rostlinami houseníčku a řepky, které měly tento gen



exprimován v postembryonálním vývoji (Boutilier et al., 2002). Tyto rostliny spontánně tvořily embrya či jim podobné struktury na svých děložních nebo prvních pravých listech. Nicméně na druhou stranu se ukazuje, že indukce tvorby embryí je možná jenom na mladších, málo diferencovaných strukturách, což podporuje i teorii o nezbytnosti dediferenciace.

U dalších rostlinných druhů sice nebyla pozorována spontánní tvorba embryí, nicméně byl prokázán pozitivní vliv na indukci somatické embryogeneze či na regenerační schopnosti rostliny. Například u rostlin tabáku, které exprimovaly gen *BBM*, stačilo k indukci somatické embryogeneze dodání cytokininů (Srinivasan et al., 2006). Expres *BBM* může též pomoci při množení rostlin somatickou embryogenezi u kakaovníku pravého (*Theobroma cacao*, Florez et al., 2015).

*BABY BOOM* však není jediným genem podílejícím se na regulaci embryogeneze. Jistý vliv mají zřejmě také geny *LEAFY COTYLEDON* (*LEC*). První z nich, *LEC1*, byl identifikován u mutantní rostliny houseníčku (*Arabidopsis*). Embrya těchto rostlin byla intolerantní k vysychání a jejich děložní lístky měly některé charakteristiky listů pravých (West et al., 1994), jako je přítomnost trichomů. Následně byly identifikovány další dva geny, jejichž mutantní fenotyp byl obdobný, *LEC2* a *FUS3* (*FUSCA3*, Meinke et al., 1994).



Obrázek 6: *LEC1* embryo z listu.  
Upraveno podle Lotan et al., 1998.

Přirozeně se tyto geny exprimují pouze během embryogeneze. Podílejí se například na zrání semen, hromadění některých zásobních látek (hlavně proteinů a mastných kyselin, Roscoe et al., 2015) nebo brání předčasnému vývoji v semenáčky (Lotan et al., 1998). Indukce exprese *LEC1* v pozdějších vývojových stádiích vedla k obdobnému fenotypu jako u *BBM* (Lotan et al., 1998). Na listech některých rostlin se vytvořily struktury připomínající embrya s množstvím děloh (viz Obrázek 6). Podobný projev byl pozorován i při expresi *LEC2* v postembryonálním vývoji (Stone et al., 2001).

Genů s podobnou nebo související funkcí je však zřejmě více. Zatímco *LEC2*, *FUS3* a *ABI3* (někdy též souhrnně nazývané AFL) se řadí mezi transkripční faktory s B3 doménou (Roscoe et al., 2015), *LEC1* a *LEC1-like* kódují HAP3 podjednotku transkripčního faktoru rozeznávajícího v promotorech regulovaných genů sekvenci CCAAT (Kwong et al., 2003). Tyto geny regulují celou řadu procesů, včetně aktivace genů pro syntézu auxinů (Stone et al., 2008). Též byly detekovány v několik dní starém embryogenním pylu řepky (Malik et al., 2007).

Souvisejícím genem je i *PICKLE*, kódující faktor CDH3 remodelující chromatin. Jeho funkcí je mimo jiné represe genů specifických pro embryogenezi (jako jsou právě *LEC1* a *LEC2*

a jim podobné geny) během vegetativního vývoje a jeho nefunkčnost opět vede ke tvorbě struktur specifických pro embrya (Rider et al., 2003).

Přehled genů podílejících se na regulaci nejen pylové embryogeneze samozřejmě není úplný ani konečný. Daly by se jmenovat i další související geny, nicméně současný rozsah poznatků o genetické regulaci embryogeneze by vystačil na samostatnou práci.

## **5. Problémy s androgenezí**

Haploidní či dihaploidní rostliny získané androgenezí mají množství výhod, například pro šlechtění či studium (viz kap. Význam). Nicméně zároveň je s jejich tvorbou a následným využitím spojena řada různých komplikací. Problémy mohou ležet ve všech rovinách jejich vzniku, od indukce buněčného dělení, přes tvorbu embryí či kalusu, regeneraci životaschopných semenáčků až po jejich praktické využití k odvození rostlinných kultivarů s novými či vylepšenými vlastnostmi.

Pravděpodobně existuje množství rostlin, u kterých androgenese dosud nebyla úspěšná. Prakticky je však obtížné, ne-li nemožné rozlišit případy neúspěchu od případů, kdy se o indukci androgenese zatím vůbec nikdo nepokusil. V obou případech totiž obvykle není o čem publikovat. Další možností může být sice úspěšná indukce androgenese, nicméně vývoj se v určitém stádiu zastaví a dále nepokračuje. Ač u některých rostlin bylo dalšího vývoje dosaženo pozdější modifikací použitého protokolu, v jiných případech úspěšná regenerace rostlin zatím nebyla potvrzena, například u meruňky obecné (*Prunus armeniaca*, (Germanà et al., 2011)).

Ani úspěšná regenerace semenáčků však neznamená konec všem problémům. Množství získaných rostlin může být pro praktické využití velmi malé, nebo mohou být regenerovány rostliny vyšších ploidií (např. již zmíněné kiwi - Wang et al., 2018). V některých případech však může být vyšší frekvence tvorby spontánních diploidů naopak výhodná. Pokud je naším záměrem využít nové genotypy k dalšímu křížení, ušetříme jinak nezbytný krok diploidizace. V jiných případech může být výhodné mít k dispozici přímo haploidní genom.

Některé popsané problémy mohou být řešitelné s použitím kultur izolovaných pylových zrn. Množství vyvinutých embryí například není omezeno velikostí samotného prašníku. Nicméně zvládnutí mikrosporových kultur bývá obvykle o něco obtížnější a náročnější, nežli prostá prašníková kultura (více viz kap. Kultura izolovaných mikrospor).

Nicméně ani rostliny s dobře zvládnutou pylovou embryogenezí nemusejí být v praxi příliš využívány. Kultivary vyšlechtěné s přispěním androgenese se využívají prakticky jen u zlomku z rostlin, u kterých byla regenerace dihaploidních rostlin zvládnutá. Převážně se jedná

o různé druhy plodin, které jsou vhodné ke konzumaci. Naopak durman, u kterého byla androgeneze poprvé objevená a zřejmě i dobře zvládnutá, se už prakticky ani nevyužívá jako modelová rostlina (viz např. (Seguí-Simarro, 2016)). Samostatnou kapitolou v problematice androgeneze a tvorby (di)haploidních rostlin je pak albinismus.

## 5.1 Albinismus

Albinismus je poměrně běžným fenoménem vyskytujícím se u některých jednoděložných rostlin, hlavně obilnin. Androgenezi se sice podaří indukovat a případně z embryí regenerovat semenáčky, často ale postrádají chlorofyl, a tudíž jsou neživotaschopné mimo podmínky *in vitro* a nepoužitelné ke šlechtění nových odrůd. Z celkového množství získaných semenáčků bylo například u žita 75 % regenerovaných rostlin albinistických (Wenzel et al., 1977) nebo o něco později u triticales stále více než 50 % (Pauk et al., 2000). V extrémních případech může být frekvence albinistických rostlin u jednoho kultivaru daného rostlinného druhu zanedbatelná, zatímco u jiného se může blížit 100 % (např. Caredda et al., 2000). Regenerace zelených rostlin tedy znamená další rovinu problémů, kterou je třeba se při tvorbě dihaploidních rostlin zabývat.

Výzkum ve snaze identifikovat možné příčiny vzniku albinistických rostlin probíhá i dnes. Zároveň se hledají možnosti ovlivnění frekvence jejich vzniku. Klíčový je vývoj plastidů. U albinistických rostlin zřejmě nedojde k přepnutí jejich vývojového programu a namísto chloroplastů diferencují spíše v amyloplasty, obdobně jako při gametofytickém vývoji (Caredda et al., 2000). Zároveň často dochází k delecím v plastidovém genomu, hlavně v oblastech kódujících fotosyntetické proteiny (např. Harada et al., 1992), ač to není pravidlem. Obecně však bývá exprese genů fotosyntézy minimální (Ankele et al., 2005).

Vliv má nepochybně též jaderný genom. Bylo prokázáno, že schopnost či neschopnost tvorby zelených rostlin androgenezí je dědičná, pravděpodobně polygenně (Larsen et al., 1991). Hlavně v posledních letech tedy probíhají snahy identifikovat v genomech rostlin lokusy kvantitativních znaků (označované jako QTL) korelující s albinismem (např. Krzewska et al., 2015). Částečným řešením problematiky vzniku albinistických rostlin mohou být též modifikace postupů, jelikož zastoupení regenerovaných zelených rostlin závisí někdy kromě genotypu též na kultivačních podmínkách, typu indukčního stresu či složení médií (např. Jacquard et al., 2009).

## 6. Význam a využití

Rostliny získané androgenezí mohou být velmi užitečné. Pokud jsou haploidní, můžeme u nich snadno odhalit projevy případných recesivních alel a mutací, jelikož v haploidním stavu nemohou být překryty alelou dominantní. Takovéto rostliny tedy může být výhodné použít k výzkumu, ať už k analýze mutantů, mapování genů či jejich sekvenování. Nevýhodou haploidních rostlin je však jejich sterilita. Mezi rostlinami získanými androgenezí však často také bývá různé množství spontánních diploidů, u nichž došlo k duplikaci genomu, případně lze diploidizaci indukovat uměle. Získané dihaploidní rostliny jsou poté kompletně homozygotní. Tyto rostliny pak mohou nalézt své využití hlavně ve šlechtění při tvorbě nových odrůd.

Svůj význam však nemají pouze získané haploidní či dihaploidní rostliny jakožto „konečné produkty androgenese“. I samotné embryogenní mikrospory mohou být vhodným materiálem ke studiu. Pylová embryogeneze totiž v ideálním případě představuje regeneraci celé rostliny z jediné buňky, která má jinak zásadně odlišný účel.

### 6.1 Šlechtění

Homozygotní rostliny představují pro šlechtitele ideální výchozí materiál, tudíž se již od počátků studia androgenese uvažovalo o možném využití získaných dihaploidů k tvorbě rostlin s novými vlastnostmi. Zároveň s rostoucí populací vzniká i poptávka po nových, výnosnějších kultivarech plodin. Tvorba dihaploidních rostlin pomocí androgenese tedy může být jednou z možností, jak toho dosáhnout.

Možným využitím haploidních technik ve šlechtění může být fixace rodičovských genotypů pro následnou tvorbu F1 heterózního osiva. Takzvaný heterózní efekt mívá totiž pozitivní vliv na životaschopnost a výnosy dané plodiny (Hochholdinger and Hoecker, 2007). Heterózního osiva se často využívá hlavně u zeleniny. Nabízí se zde tedy potenciální využití dihaploidních rostlin, nicméně zřejmě kvůli nedostatečně zvládnuté androgenezi u řady rostlinných druhů literatura o tomto možném využívání spíše zatím mlčí.

Další možností může být fixace genotypů plodin s vyššími výnosy. Pokud indukujeme pylovou embryogenezi u F1 hybridu, můžeme regenerovat rostlinu s vysokými výnosy a zároveň s uniformním potomstvem (Veilleux, 1994). Produkce heterózního osiva tedy není nutná. V praxi často trvá několik let, než se samoopylováním dosáhne dostatečné homozygotity, zatímco s použitím haploidních technik můžeme tuto dobu zkrátit na jednu generaci. Doba šlechtění nové odrůdy se tak dá zkrátit někdy i na polovinu (např. Tuvešson et al., 2007).



První rostlinné kultivary, vzniklé za přispění experimentálních haploidních technik, byly brukev řepka (Thompson, 1972) a ječmen (Ho and Jones, 1980), ač k jejich získání byly pravděpodobně použity klasické metody. Dnes je k dispozici minimálně 300 kultivarů, na jejichž vzniku se podílely DH rostliny (Germana, 2011). Nejvíce DH kultivarů existuje u ječmene, brukve řepky a pšenice (viz. Maluszynski et al., 2003), ač nějaké kultivary byly vyšlechtěny i u tabáku, rýže, případně dalších plodin. Zároveň se však špatně dohledávají jak přesné počty, tak i originální citace. Informace se distribují hlavně prostřednictvím vzájemně se citujících knih a přehledných článků a někteří šlechtitelé si i nechávají původ svých kultivarů pro sebe.

Ne vždy jsou však experimentální techniky k získání haploidů a dvojitých haploidů nezbytné. U kukuřice byly například vyvinuty metody k identifikaci a využití spontánních haploidů ještě před rozvojem experimentálních metod (Chase, 1969). Kukuřice zároveň patří do skupiny rostlin, u níž byla regenerace haploidních rostlin kultivací pylových zrn zpočátku obtížná.

Vhodné může být použití androgeneze i u cizosprašných rostlin, dvoudomých rostlin či u rostlin s velmi dlouhým a pomalým reprodukčním cyklem, jako jsou dřeviny. Získání homozygotních rostlin je u těchto druhů jinak prakticky nemožné. Příkladem dvoudomé rostliny, u které byl úspěšně získán DH kultivar, je chřest (viz. Veilleux, 1994). U stromů je zájem hlavně o ovocné stromy, které zároveň bývají často i cizosprašné. Podařilo se například získat například DH jabloň domácí (*Malus domestica*, Kadota et al., 2002). Mimo jabloně je však androgeneze možná asi jen u necelých dvaceti dalších druhů stromů (Srivastava and Chaturvedi, 2008).

Je zřejmé, že velká většina využívaných DH rostlin produkuje potraviny. Často je u nich možné poměrně snadno regenerovat větší množství DH rostlin (např. ječmen), nebo význam získané DH plodiny převáží nad komplikacemi spojenými s její tvorbou (např. pšenice). V menším měřítku se uvažuje o přenesení techniky i na rostliny obsahující nejen farmaceuticky významné látky. Často se totiž využívají přirozené variety, u kterých je obsah žádaných látek velmi variabilní. S pomocí DH technik by mohlo být možné získat uniformní produkci (Ferrie, 2007). Nějakých výsledků již zřejmě bylo dosaženo, nicméně ve srovnání s produkcí potravinových plodin jsou prakticky minimální. Uvažuje se též o možné tvorbě DH kultivarů u některých okrasných květin, například u sasanky věncové (*Anemone coronaria*, Copetta et al., 2018).

## 6.2 Studium

Mimo potenciálního využití ve šlechtění představují mikrosporové kultury také unikátní systém ke studiu. Studium mikrosporových kultur zřejmě vedlo k identifikaci různých stresů a k pochopení stresové odpovědi (Shariatpanahi et al., 2006). Nově získané poznatky pak mohly být aplikovány zpětně na mikrosporové kultury a pomoci tak zvýšit efektivitu produkce pylových embryí.

Zároveň se však mikrosporové kultury dají použít jako modelový materiál ke studiu embryogeneze jako takové. Podobné regulační mechanismy vedoucí ke vzniku embryí jsou kromě mikrosporových embryí aktivní zřejmě též u somatické embryogeneze i u embryí zygotických (viz kap. Genetická regulace). Použití mikrosporových kultur má ale oproti zygotickým embryím jednu nespornou výhodu. Vytvářející se embryo totiž není obklopené dalšími pletivy, nýbrž je v ideálním případě naprosto volné, a je tedy možné přímo sledovat vývoj jednoho konkrétního embrya. Jeden z klíčových regulačních genů podílející se na průběhu embryogeneze, *BABY BOOM*, byl poprvé identifikován a popsán též u mikrosporových kultur, konkrétně u řepky (Boutilier et al., 2002).

Další potenciální využití haploidních rostlin je při genetickém mapování. Dihaploidní rostliny díky své homozygotitě představují pro mapování vhodný materiál (viz. Tuvešson et al., 2007). Mapují se například již zmíněné lokusy kvantitativních znaků (QTL). Získané poznatky o pozicích genů přispívajících například k odolnosti rostlin vůči patogenům či k vyšším výnosům se pak mohou opět aplikovat při šlechtění nových odrůd.

Vhodné využití haploidních technik je možno hledat též při tvorbě a selekci nových mutantů. Většina mutací totiž bývá recesivní a obvykle se projeví až o několik generací později. Aplikace DH technik na gamety mutovaných rostlin, případně aplikace mutagenu přímo na embryogenní gamety, může tento proces opět urychlit (Szarejko and Forster, 2007).

Haploidní rostliny nakonec představují i vhodný výchozí materiál pro transformace. Pokud se v časném stádiu pylové embryogeneze vnese transgen a poté dojde k duplikaci genomu, vzniklá diploidní rostlina je poté homozygotní ve všech genech, včetně transgenu. Takto byla například transformována pylová zrna ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Kumlehn et al., 2006).

## 7. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dostupné znalosti o androgenezi v rostlinné říši. Od objevu pylové embryogeneze v *in vitro* podmínkách uběhlo již více než 50 let. Během této doby vzniklo množství modifikací původního protokolu a technika byla aplikována na řadu rostlinných druhů. Nicméně stále jsou mezi nimi velké rozdíly v účinnosti tvorby dihaploidních rostlin. Zatímco u několika vybraných druhů je možná regenerace DH rostlin ve velkém, množství plodin těmito technikám stále odolává. Vyhledky na využití jsou zatím hlavně v zemědělství při šlechtění nových, výnosnějších a odolnějších odrůd plodin, převážně obilnin k užití stále zvětšující se lidské populace (Germana, 2011). V cestě rozšíření této techniky na další druhy plodin stojí hlavně malá účinnost regenerace DH rostlin, případně jejich nízká životaschopnost. Albinismus je též specifický a závažný problém, jehož úplné vyřešení je zatím v nedohlednu.

V blízké budoucnosti se dá pravděpodobně očekávat pár nových kultivarů u některých zemědělsky významných plodin. Možná je i budoucí aplikace techniky na léčivé či jinak ekonomicky významné rostliny. Tvorba DH okrasných rostlin je však s výjimkou těch, u nichž je androgenese dobře zvládnutá, spíše nepravděpodobná.

## 8. Seznam použité literatury

- Abdollahi MR, Rashidi S** (2018) Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE* **133**: 39–49
- Agarwal PK, Agarwal P, Custers JBM, Liu C, Bhojwani SS** (2006) PCIB and auxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea*. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE* **86**: 201–210
- Ahmadi B, Shariatpanahi ME, da Silva JAT** (2014) Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE* **116**: 343–351
- Alan A, Brants A, Cobb E, Goldschmied P, Mutschler M, Earle E** (2004) Fertile gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. *PLANT SCIENCE* **167**: 1055–1066
- Amos JA, Scholl RL** (1978) Induction of Haploid Callus from Anthers of 4 Species of *Arabidopsis*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **90**: 33–43
- Anagnostakis SL** (1974) Haploid Plants from Anthers of Tobacco - Enhancement with Charcoal. *Planta* **115**: 281–283
- Ankele E, Heberle-Bors E, Pfosser MF, Hofinger BJ** (2005) Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiologiae Plantarum* **27**: 651–665
- Barinova I, Clement C, Martiny L, Baillicul F, Soukupova H, Heberle-Bors E, Touraev A** (2004) Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *PLANTA* **219**: 141–146
- Barnabas B** (2003) Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). In M Maluszynski, KJ Kasha, BP Forster, I Szarejko, eds, *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Springer, pp 65–70
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME, Bergner AD** (1922) A haploid mutant in the Jimson Weed, “*datura stramonium*.” *Science* **55**: 646–647
- Bourgin J, Nitsch J** (1967) Production of Haploids *Nicotiana* from Excised Stamens. *Annales De Physiologie Vegetale* **9**: 377–382
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C-M, André A. M. van Lammeren, Brian L. A. Miki, et al** (2002) Ectopic Expression of *BABY BOOM* Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell* **14**: 1737–1749
- Careda S, Doncoeur C, Devaux P, Sangwan RS, Clément C** (2000) Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sexual Plant Reproduction* **13**: 95–104
- Castillo A, Cistué L, Vallés M, Soriano M** (2009) Chromosome doubling in monocots. In A Touraev, B Forster, Jain SM, eds, *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Dordrecht, pp 329–338
- Chase SS** (1969) Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Bot Rev* **35**: 117–168
- Chuck G, Meeley R, Hake S** (1998) The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like

- gene indeterminate spikelet1. *GENES & DEVELOPMENT* **12**: 1145–1154
- Clausen RE, Lammerts WE** (1929) Interspecific Hybridization in *Nicotiana*. X. Haploid and Diploid Merogony. *The American Naturalist* **63**: 279–282
- Copetta A, Dei F, Marchioni I, Cassetti A, Ruffoni B** (2018) Effect of thermal shock in the development of androgenic plants of *Anemone coronaria* L.: influence of genotype and flower parameters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **134**: 55–64
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Absciscic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. In Merchant, S and Briggs, WR and Ort, D, ed, *ANNUAL REVIEW OF PLANT BIOLOGY*, VOL 61. *ANNUAL REVIEWS*, 4139 EL CAMINO WAY, PO BOX 10139, PALO ALTO, CA 94303-0897 USA, pp 651–679
- Daghma DES, Hensel G, Rutten T, Melzer M, Kumlehn J** (2014) Cellular dynamics during early barley pollen embryogenesis revealed by time-lapse imaging. *Frontiers in Plant Science* **5**: 675
- Engvild K, Lindelau, i, Lundqvist, a** (1972) Anther Cultures of *Datura-Innoxia* - Flower Bud Stage and Embryoid Level. *Hereditas* **72**: 331–332
- Engvild KC** (1974) Plantlet Ploidy and Flower-Bud Size in Tobacco Anther Cultures. *Hereditas* **76**: 320–322
- Engvild KC** (1973) Triploid *Petunias* from Anther Cultures. *Hereditas* **74**: 144–147
- Ferrie AMR** (2007) Doubled haploid production in nutraceutical species: a review. *Euphytica* **158**: 347–357
- Ferrie AMR, Caswell KL** (2011) Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **104**: 301–309
- Florez SL, Erwin RL, Maximova SN, Gultinan MJ, Curtis WR** (2015) Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous *BABY BOOM* transcription factor. *BMC PLANT BIOLOGY*. doi: 10.1186/s12870-015-0479-4
- Genschik P, Criqui M, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J** (1998) Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *PLANT CELL* **10**: 2063–2075
- Germana MA** (2011) Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *PLANT CELL REPORTS* **30**: 839–857
- Germanà MA, Chiancone B, Padoan D, Bárány I, Risueno M-C, Testillano PS** (2011) First stages of microspore reprogramming to embryogenesis through anther culture in *Prunus armeniaca* L. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 152–157
- Gresshoff PM, Doy CH** (1972) Haploid *Arabidopsis-Thaliana* Callus and Plants from Anther Culture. *Australian Journal of Biological Sciences* **25**: 259+
- Guha S, Maheshwari SC** (1964) In vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature* **204**: 497
- Guha S, Maheshwari SC** (1966) Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of *Datura* in vitro. *Nature* **212**: 97
- Guha S, Maheshwari SC** (1967) Development of Embryoids from Pollen Grains of *Datura* in vitro.

- Haberlandt GJF** (1902) Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsberichte **111**: 69–91
- Harada T, Ishikawa R, Niizeki M, Saito K** (1992) Pollen-derived rice calli that have large deletions in plastid DNA do not require protein synthesis in plastids for growth. Molecular and General Genetics MGG **233**: 145–150
- Hause B, van Veenendaal WLH, Hause G, van Lammeren AAM** (1994) Expression of Polarity during early Development of Microspore-derived and Zygotic Embryos of *Brassica napus* L. cv. Topas. Botanica Acta **107**: 407–415
- Heberle-Bors E, Reinert J** (1979) Androgenesis in Isolated Pollen Cultures of *Nicotiana Tabacum*: Dependence upon Pollen Development. Protoplasma **99**: 237–245
- Ho K, Jones G** (1980) MINGO BARLEY. Canadian Journal of Plant Science **60**: 279–280
- Hochholdinger F, Hoecker N** (2007) Towards the molecular basis of heterosis. Trends Plant Sci **12**: 427–432
- Jacquard C, Nolin F, Hécart C, Grauda D, Rashal I, Dhondt-Cordelier S, Sangwan RS, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clément C** (2009) Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. Plant Cell Reports **28**: 1329–1339
- Johansson L, Eriksson T** (1977) Induced Embryo Formation in Anther Cultures of Several Anemone Species. Physiologia Plantarum **40**: 172–174
- Kadota M, Han D, Niimi Y** (2002) Plant regeneration from anther-derived embryos of apple and pear. HORTSCIENCE **37**: 962–965
- Kameya T, Hinata K** (1970) Induction of Haploid Plants from Pollen Grains of Brassica. Japanese Journal of Breeding **20**: 82–87
- Kanta K** (1960) Intra-ovarian Pollination in *Papaver rhoeas* L. Nature **188**: 683
- Kanta K, Swamy NSR, Maheshwari P** (1962) Test-Tube Fertilization in a Flowering Plant. Nature **194**: 1214
- Kasha K, Hu T, Oro R, Simion E, Shim Y** (2001a) Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY **52**: 1227–1238
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Shim YS** (2003) Barley isolated microspore culture protocol. In KJ Kasha, ed, Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Springer, pp 43–47
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR** (2001b) An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. Euphytica **120**: 379–385
- Kimber G, Riley R** (1963) Haploid Angiosperms. Bot Rev **29**: 480–531
- Kohlenbach HW, Wernicke W** (1978) Investigations on the Inhibitory Effect of Agar and the Function of Active Carbon in Anther Culture. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie **86**: 463–472
- Koltunow AM** (1993) Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. The Plant Cell **5**: 1425–1437

- Krzewska M, Czyczyło-Mysza I, Dubas E, Golebiowska-Pikania G, Zur I** (2015) Identification of QTLs associated with albino plant formation and some new facts concerning green versus albino ratio determinants in triticale (*xTriticosecale* Wittm.) anther culture. *EUPHYTICA* **206**: 263–278
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G, Becker D, Loerz H** (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL* **4**: 251–261
- Kwong R, Bui A, Lee H, Kwong L, Fischer R, Goldberg R, Harada J** (2003) LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *PLANT CELL* **15**: 5–18
- Lantos C, Juhász AG, Somogyi G, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Pauk J** (2009) Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **97**: 285–293
- Larsen ET, Tuvešson IKD, Andersen SB** (1991) Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics* **82**: 417–420
- Lazaridou T, Pankou C, Xynias I, Roupakias D** (2016) Effect of D Genome on Wheat Anther Culture Response after Cold and Mannitol Pretreatment. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **58**: 95–102
- Lentini Z, Reyes P, Martínez CP, Roca WM** (1995) Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Science* **110**: 127–138
- Lichter R** (1982) Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **105**: 427–434
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MA., Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1998) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 Is Sufficient to Induce Embryo Development in Vegetative Cells. *Cell* **93**: 1195–1205
- Maheshwari SC, Rashid A, Tyagi AK** (1982) Haploids from Pollen Grains -- Retrospect and Prospect. *American Journal of Botany* **69**: 865–879
- Maheshwari SC, Tyagi AK, Malhotra K, Sopory SK** (1980) Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms — the current status. *Theoretical and Applied Genetics* **58**: 193–206
- Malik MR, Wang F, Dirpaul JM, Zhou N, Polowick PL, Ferrie AMR, Krochko JE** (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *PLANT PHYSIOLOGY* **144**: 134–154
- Maluszynski M, Kasha K, Forster BP, Szarejko I** (2003) Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Springer
- Maraschin S de F, Caspers M, Potokina E, Wuelfert F, Graner A, Spaink HP, Wang M** (2006) CDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* **127**: 535–550
- Maraschin S, Gaussand G, Pulido A, Olmedilla A, Lamers G, Korthout H, Spaink H, Wang M** (2005a) Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. *PLANTA* **221**: 459–470
- Maraschin S, Lamers G, de Pater B, Spaink H, Wang M** (2003) 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* **54**: 1033–1043

- Maraschin S, de Priester W, Spaink H, Wang M** (2005b) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1711–1726
- Martin B, Widholm JM** (1996) Ploidy of small individual embryo-like structures from maize anther cultures treated with chromosome doubling agents and calli derived from them. *Plant Cell Reports* **15**: 781–785
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC** (1994) Leafy Cotyledon Mutants of Arabidopsis. *Plant Cell* **6**: 1049
- Mishra R, Gjn R, N Rao R** (2013) Effect of cold pretreatment and phytohormones on anther culture efficiency of two indica rice (*Oryza sativa* L.) hybrids: Ajay and Rajalaxmi. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* **1**: 69
- Moose S, Sisco P** (1996) Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *GENES & DEVELOPMENT* **10**: 3018–3027
- Munoz-Amatriain M, Svensson JT, Castillo A-M, Cistue L, Close TJ, Valles M-P** (2006) Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* **127**: 551–560
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497
- Nakata K, Tanaka M** (1968) Differentiation of Embryoids from Developing Germ Cells in Anther Culture of Tobacco. *Jpn J Genet* **43**: 65–71
- Nava JLR, Buonamici A, Vendramin GG, Pichot C** (2010) Molecular evidence for the natural production of homozygous *Cupressus sempervirens* L. lines by *Cupressus dupreziana* seed trees. *HEREDITY* **104**: 185–190
- Niizeki H, Oono K** (1968) Induction of Haploid Rice Plant from Anther Culture. *Proceedings of the Japan Academy* **44**: 554–557
- Nitsch C** (1974) La culture de pollen isolé sur milieu synthétique (Culture of isolated pollen on synthetic medium). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences Série D, Sciences naturelles* **278**: 1031–1034
- Nitsch C, Norreel B** (1973) Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthere ou isolé de l'anthere (Effect of thermal shock on embryogenic power of *Datura innoxia* cultured in anther or isolated from anther). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences Série D, Sciences naturelles* **276**: 303–306
- Nitsch J** (1951) Growth and Development Invitro of Excised Ovaries. *Am J Bot* **38**: 566–577
- Nitsch J** (1969) Experimental Androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* **19**: 389–404
- Nitsch J, Nitsch C** (1969) Haploid Plants from Pollen Grains. *Science* **163**: 85–87
- Nitsch J, Nitsch C, Hamon S** (1968) Réalisation expérimentale de l'androgénèse chez divers *Nicotiana* (Experimental Production of Androgenesis in Various *Nicotiana*). *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales* **162**: 369–372
- Nitsch JP, Nitsch C, Hamon S** (1969) Production de *Nicotiana* diploides à partir de cals haploides cultivés in vitro (Generation of Diploid *Nicotiana* from haploid plants grown in vitro). *Comptes*



rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences Série D, Sciences naturelles **269**: 1275-

- Pauk J, Puolimatka M, Toth K, Monostori T** (2000) In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE* **61**: 221–229
- Pechan PM, Bartels D, Brown DCW, Schell J** (1991) Messenger-RNA and protein changes associated with induction of Brassica microspore embryogenesis. *Planta* **184**: 161–165
- Pichot C, El Maataoui M** (2000) Unreduced diploid nuclei in Cupressus dupreziana A. Camus pollen. *Theor Appl Genet* **101**: 574–579
- Pichot C, Liens B, Nava JLR, Bachelier JB, El Maataoui M** (2008) Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen. *Genetics* **178**: 379–383
- Pichot C, Maataoui M, Raddi S, Raddi P** (2001) Surrogate mother for endangered Cupressus. *Nature* **412**: 39–39
- Rashid A, Street HE** (1973) Development of Haploid Embryoids from Anther Cultures of Atropa-Belladonna-L. *Planta* **113**: 263–270
- Reinert J, Bajaj YPS, Heberle E** (1975) Induction of Haploid Tobacco Plants from Isolated Pollen. *Protoplasma* **84**: 191–196
- Rider S, Henderson J, Jerome R, Edenberg H, Romero-Severson J, Ogas J** (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in Arabidopsis. *PLANT JOURNAL* **35**: 33–43
- Rieger R, Michaelis A, Green MM** (1968) A glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular, 3.
- Rodríguez-Riaño T, Dafni A** (2007) Pollen–Stigma Interference in Two Gynodioecious Species of Lamiaceae with Intermediate Individuals. *Annals of Botany* **100**: 423–431
- Roscoe TT, Guillemainot J, Bessoule J-J, Berger F, Devic M** (2015) Complementation of Seed Maturation Phenotypes by Ectopic Expression of ABSCISIC ACID INSENSITIVE3, FUSCA3 and LEAFY COTYLEDON2 in Arabidopsis. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY* **56**: 1215–1228
- Santos-Serejo JA, Aguiar-Perecin MLR** (2016) Breakage-fusion-bridge cycles and de novo telomere formation on broken chromosomes in maize callus cultures. *Genome* **59**: 367–378
- Seguí-Simarro JM** (2016) Androgenesis in Solanaceae. *In* MA Germanà, M Lambardi, eds, *In vitro Embryogenesis in Higher Plants*. pp 209–244
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A** (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum* **127**: 519–534
- Shtereva LA, Zagorska NA, Dimitrov BD, Kruleva MM, Oanh HK** (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Reports* **18**: 312–317
- Sidhu PK, Davies PA** (2009) Regeneration of fertile green plants from oat isolated microspore culture. *Plant Cell Reports* **28**: 571–577
- Sopory S, Maheshwari S** (1976) Development of Pollen Embryoids in Anther Cultures of Datura-Innoxia .1. General Observations and Effects of Physical Factors. *J Exp Bot* **27**: 49–57

- Srinivasan C, Liu Z, Heidmann I, Supena EDJ, Fukuoka H, Joosen R, Lambalk J, Angenent G, Scorza R, Custers JBM, et al** (2006) Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* **225**: 341
- Srivastava P, Chaturvedi R** (2008) In vitro androgenesis in tree species: An update and prospect for further research. *Biotechnology Advances* **26**: 482–491
- Stockinger E, Gilmour S, Thomashow M** (1997) Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **94**: 1035–1040
- Stone S, Kwong L, Yee K, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer R, Goldberg R, Harada J** (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* **98**: 11806–11811
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong LW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh T-F, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2008) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3151–3156
- Sunderland N** (1971) Anther culture: a progress report. *Science Progress (1933- )* **59**: 527–549
- Sunderland N, Dunwell JM** (1977) Anther and pollen culture. *Plant tissue and cell culture*
- Sunderland N, Evans LJ** (1980) Multicellular Pollen Formation in Cultured Barley Anthers II. The A-Pathway B-Pathway and C-Pathway. *Journal of Experimental Botany* **31**: 501–514
- Sunderland N, Wicks F** (1971) Embryoid Formation in Pollen Grains of *Nicotiana-Tabacum*. *J Exp Bot* **22**: 213–+
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM** (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Reports* **25**: 1–10
- Szarejko I, Forster BP** (2007) Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica* **158**: 359–370
- Thompson KF** (1972) Oil-seed rape. Reports of the Plant Breeding Institute. Cambridge University Press, pp 94–96
- TouraeV A, Ilham A, Vicente O, HeberleBors E** (1996a) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *PLANT CELL REPORTS* **15**: 561–565
- TouraeV A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E** (1996b) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* **9**: 209–215
- TouraeV A, Vicente O, HeberleBors E** (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science* **2**: 297–302
- Tulecke W** (1959) The Pollen Cultures of C. D. Larue: A Tissue from the Pollen of *Taxus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **86**: 283–289
- Tulecke WR** (1953) A Tissue Derived from the Pollen of *Ginkgo biloba*. *Science* **117**: 599–600

- Turesson S, Dayteg C, Hagberg P, Manninen O, Tanhuanpää P, Tenhola-Roininen T, Kiviharju E, Weyen J, Förster J, Schondelmaier J, et al** (2007) Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. *Euphytica* **158**: 305–312
- Tyagi AK, Rashid A, Maheshwari SC** (1979) High Frequency Production of Embryos in *Datura innoxia* From Isolated Pollen Grains by Combined Cold Treatment and Serial culture of Amnthers in Liquid Medium. *Protoplasma* **99**: 11–17
- Veilleux R** (1994) Development of New Cultivars via Anther Culture. *HORTSCIENCE* **29**: 1238–1241
- Wang G-F, Qin H-Y, Sun D, Fan S-T, Yang Y-M, Wang Z-X, Xu P-L, Zhao Y, Liu Y-X, Ai J** (2018) Haploid plant regeneration from hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* Planch.) anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **134**: 15–28
- Weatherhead MA, Burdon J, Henshaw GG** (1978) Some Effects of Activated Charcoal as an Additive to Plant Tissue Culture Media. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* **89**: 141–147
- Wenzel G, Hoffmann F, Thomas E** (1977) Increased Induction and Chromosome Doubling of Androgenetic Haploid Rye. *Theoretical and Applied Genetics* **51**: 81–86
- Wernicke W, Kohlenbach HW** (1976) Investigations on Liquid Culture Medium as a Means of Anther Culture in *Nicotiana*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* **79**: 189–198
- West M, Yee KM, Danao J, Zimmerman JL, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (1994) LEAFY COTYLEDON1 Is an Essential Regulator of Late Embryogenesis and Cotyledon Identity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 1731
- White PR** (1954) The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press Co.
- Yu F, Park S, Rodermel S** (2004) The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *PLANT JOURNAL* **37**: 864–876
- Zapata-Arias FJ** (2003) Laboratory protocol for anther culture technique in rice. *In* M Maluszynski, KJ Kasha, BP Forster, I Szarejko, eds, *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Springer, pp 109–116
- Zhang X-M, Wolfe LM** (2016) Stigma receptivity over the lifetime of the hermaphroditic flower of *Elsholtzia rugulosa* was negatively correlated with pollen viability. *Plant Signaling & Behavior* **11**: e1259052
- Zhao J, Newcomb W, Simmonds D** (2003) Heat-shock proteins 70 kDa and 19 kDa are not required for induction of embryogenesis of *Brassica napus* L. cv. topas microspores. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY* **44**: 1417–1421
- Zheng M, Weng Y, Liu W, Konzak C** (2002) The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* **20**: 802–807
- Zhou J, Tang X, Martin G** (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO JOURNAL* **16**: 3207–3218